

ゴルジ体由来微小管形成の情報伝達機構

横浜市立大学大学院
生命ナノシステム科学研究科
林 郁子

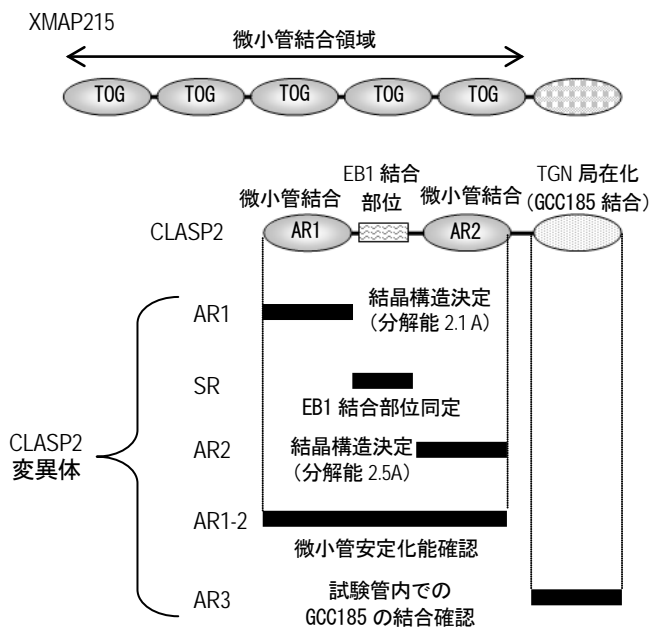
1. はじめに

細胞骨格因子のひとつ、微小管は細胞極性形成に重要な役割を果たす。その制御因子にはこれまでモーター蛋白質が知られてきたが、この10年の間に微小管の伸長端に作用してその動的不安定性を制御する微小管伸長端集積蛋白質群(+TIPs)が見つかった(林、生化学, 2008)。なかでもCLASPは微小管を介して染色体分離・細胞分裂・細胞移動に深く関わっていると考えられている。この制御にはGSK3 β をはじめとする様々なリン酸化酵素や+TIPsであるEB1とCLIPs、さらにトランスゴルジ網(TGN)局在分子GCC185などの結合分子が関わっていると考えられている(Akhmanova et al., 2001; Efimov et al., 2007)。CLASPは全長1300アミノ酸弱で複数の機能ドメインがあるにも関わらず、その分子基盤はCLASP1のN末端微小管結合性TOGドメインを除いてよくわかっていない(図1)。近年分裂酵母のCLASP相同蛋白質Clb1の全反射蛍光顕微鏡を用いた分子解析が行われ、Clb1が微小管安定化因子であることが示された(Al-Bassam et al., 2010)。私達が研究対象とするヒトのCLASPは2量体を形成するClb1と異なり単量体であること、微小管伸長端で中心的役割を果たすEB1との相互作用が存在しないことより、哺乳動物のCLASPは分裂酵母とは異なる微小管安定化機構を有することが示唆される。

(目的) CLASP2の微小管認識機構及び安定化機構を立体構造に基づく分子生物学的手法によって明らかにする。またCLASP2結合因子であるGCC185との結合部位を明らかにし、分子認識機構を探索する土台を構築する。CLASP2/GCC185分子間認識を制御する因子をプロテオーム解析にて単離することを目指す。さらにCLASP2とGCC185の認識機構を細胞内でも検証することにより、CLASPの微小管を通じての小胞輸送や細胞移動の制御機構について解明したい。

2. 方法

CLASP2の機能ドメインの組換え蛋白質発現系の構築、蛋白質調製と結晶化、構造決定と変異体の解析を目指す。試験管内における微小管認識について微小管結合実験、ゲル濾過法および光散乱実験によって解明する。またEB1との協同的微小管安定化能も解析する。さらにCLASP2の結合相手であるGCC185の結合領域をY2H法により決定し、立体構造解析および細胞生物学的解析を行う。



(図1) XMAP215 と CLASP2 のドメイン構造および本研究で作成した CLASP2 変異体

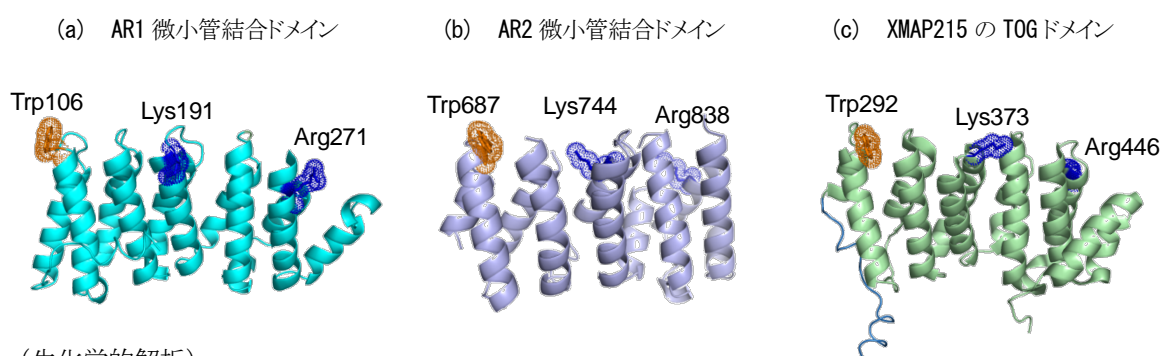
3. 結果

(結晶構造解析)

CLASP2には2つの微小管結合ドメインが存在する。昨年の助成によってこれら2つの微小管結合ドメインの立体構造をセレンメチオニン導入による多波長異常分散法によって決定した(図2(a,b))。この2つのドメインは共に微小管結合ドメインとして知られるTOGドメイン同様ヘリックス-ループ-ヘリックスが繰り返されるヒートリピード構造をもつ。この解析からCLASPもTOGドメインをタンデムにもつXMAP215と同じファミリーに属することを構造生物学的に示した。

(図2) CLASP2とXMAP215のTOGドメインの立体構造

立体構造上保存された残基をラベルした。



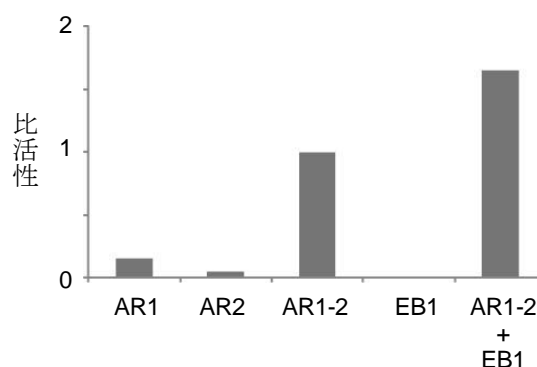
(生化学的解析)

立体構造に基づき、TOGドメインに保存される残基に変異を入れ、それらが微小管結合に重要であることを示した。またCLASP2微小管結合領域の試験管内微小管重合促進を光散乱法によって確認するとともに、EB1との結合によって微小管安定化能が促進されることを示した(図3)。CLASP2にはEB1結合部位が2か所あることが推定されるが、等温滴定型熱量計よりその結合比が1:1 (CLASP2が2分子に対しEB12量体がひとつ結合)、その結合強度は $\sim 6 \mu\text{M}$ であることがわかった。

(図3) CLASP2の試験管内における

微小管安定化反応とEB1の影響

EB1添加によりCLASP2(AR1-2)の微小管重合能が促進された。EB1単体では微小管の重合を促進することができない。



(細胞生物学的解析)

TGN局在化因子GCC185は1700弱のアミノ酸からなりコイルドコイル2量体を形成する巨大分子である。この蛋白質はRab9に依存した後期エンドソームからTGNへの輸送に必須である。近年の細胞生物学的解析から、CLASP2のC末領域がGCC185など細胞小器官に局在化する蛋白質と相互作用し、ゴルジ体由来の非中心体依存性微小管の派生に必須であることがわかってきた。私達はY2H法によりGCC185のCLASP結合領域を決定し、細胞内における挙動を調べている。現在GCC185におけるおよそ55残基の領域がCLASP結合に十分であることを試験管内および細胞内で確認している(図4)。現在、この構築系を用いてGCC185結合蛋白質を探索するとともに、結晶構造解析・核磁気共鳴法を併用して立体構造解

析を行っている。

(図4) GCC185変異体導入によるCLASP

の細胞内局在化の変化

(左) HeLa細胞における質融合GCC185変異体

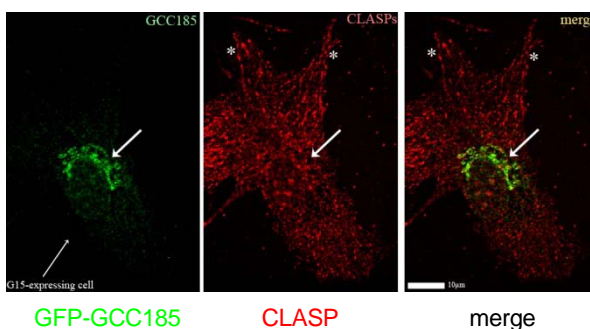
GCC185はゴルジ体に局在化する

(中央) CLASPの局在化。GCC185の高発現に

よりCLASPは局在化できない。アスタリスクは

微小管伸長端に局在化するCLASP。

(右) 左2つの画像を重ね合わせたもの



4. まとめ

微小管はすべての真核生物に保存された細胞骨格因子であり、細胞分裂・形態形成・分化に必須である。CLASPを含めた+TIPsもまた真核生物に保存されていることがわかってきたが、モデル生物として研究を進められてきた酵母と高等動物とでその制御機構が異なることが示唆されている。今後高等動物での+TIPsの微小管制御機構を立体構造を基盤としてより詳細に解析することにより、これまで不明であった微小管と細胞移動あるいは小胞輸送への情報伝達機構の解明の手掛かりとなると考える。

5. 発表論文、参考文献

Akhmanova et al. (2001) Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* **104**, 923-35.

Al-Bassam et al., (2010) CLASP Promotes Microtubule Rescue by Recruiting Tubulin Dimers to the Microtubule. *Dev Cell* **19**, 245-258.

Brouhard et al. (2008) XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**, 79-88.

Efimov et al. (2007) Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* **12**, 917-30.

Kumar et al. (2009) GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *J. Cell Biol* **184**, 895-908.

Slep & Vale (2007) Structural Basis of Microtubule Plus End Tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol Cell* **27**, 976-991.

林 郁子 (2008) 微小管伸長端結合タンパク質の分子制御機構. *生化学*, **6**, 521-530.